

应用微芯片电泳仪 MultiNA

对含有过敏性物质食品的检测



1

前言

食物过敏是人们对食物产生的一种不良反应，属机体对外源物质（过敏原）产生的一种变态反应。食物过敏的临床表现包括头痛、哮喘、过敏性鼻炎、荨麻疹、肠病综合征、过敏性休克或死亡等临床症状。过敏性疾病影响全世界近四分之一的人口，被世界卫生组织列为21世纪重点防治的三大疾病之一。其中对食物的不良反应备受人们关注，大约30%的成年人在一生中至少有1次以上对食物不良反应的经历，20%~65%的过敏性肠道综合征和消化不良患者的病因与食物过敏有关。因此，食物过敏是近几年日益被关注的一个食品安全问题。由于现在对于食物过敏治疗尚无特效方法，所以避免食用含有过敏成分的食品是最有效的疗法。

目前被世界卫生组织（WHO）确定为常见的八大类过敏原（食物）是小麦、花生、大豆、坚果类、牛奶、鸡蛋、鱼和甲壳类。美国于2006年1月1日正式实施《食品过敏原标识和消费者保护法规》。欧盟、日本、澳大利亚及新西兰等也先后出台了相关法令，要求食品标签中必须明确标识过敏原物质成分。我国在2011年发布的GB7718《预包装食品标签通则》中将致敏原作为非强制要求进行标识。目前我国要求标识的致敏原信息主要包括以下8个方面的内容：1.含麸质的谷类及其制品如小麦、黑麦、大麦、燕麦等；2.甲壳类及其制品如蟹、虾等；3.鱼类及其制品如鲈鱼、鳕鱼等；4.蛋类及其制品如鸡蛋、鸭蛋等；5.花生及其制品如花生、花生酱等；

6.大豆及其制品如大豆、豆粉等；7.乳及其制品如牛奶、乳糖等；8.坚果及其制品如杏仁、腰果等。目前，针对食品致敏原的检测，我国先后颁布了中华人民共和国出入境检验检疫行业标准：SN/T1961.1-2007食品中过敏原成分检测方法第1部分：酶联免疫法检测花生成分、SN/T1961.2-2007食品中过敏原成分检测方法第2部分：实时荧光PCR法检测花生成分。酶联免疫法（ELISA）现在是食品工业和政府食品管理部门进行食品中潜在过敏原检测和定性最常用的方法，用这种方法特定的蛋白或抗原可以与特定的酶标记的抗体键合后用显色反应来定性和定量，靠标准曲线来计算抗原的含量。实时荧光PCR法的原理是基于不同的物质具有不同的DNA序列，针对待检测过敏原的特异性序列设计引物（十几个核苷酸组成的短链）和探针（与待测序列相互配对），PCR扩增时，只有含有过敏原的样品产生荧光，不含过敏原的样品则无荧光。PCR方法对食物中特定过敏原的检测具有专一性和灵敏度高，以DNA为测试对象的方法与以蛋白质为测试对象的方法相比，热变性条件下目标DNA可以有效提取而不象蛋白提取时受食物基质的影响较大；它的另一个优点是它的稳定性，它不象蛋白质组成那样受地理条件和季节变化的影响。综上所述，食物过敏的安全性问题已引起我国监督执法部门的高度关注，因此建立可靠的灵敏度高、过敏原检测方法对于确保食品标签的一致性和消费者的安全十分必要。

2

岛津解决方案概述

岛津对于过敏性食品检测基于DNA的检测方法，针对过敏性食品的特异性DNA设计PCR引物，执行PCR反应，岛津微芯片电泳仪MultiNA检测PCR扩增产物片段长度，根据是否获得预期长度的DNA片段来判断所含过敏原的成分。本方法与实时荧光PCR探针法相

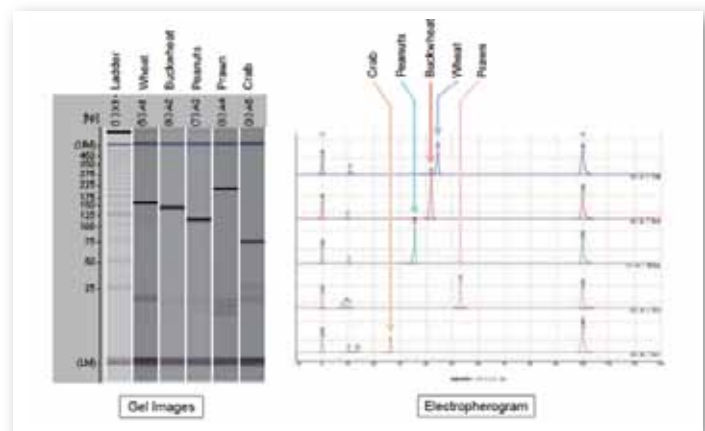
比，可一次性加入多种过敏原对应的特异性引物，根据片段的尺寸，从而快速鉴定出所含多种过敏原的种类，而实时荧光PCR探针法则需要逐一加入探针进行检测，操作繁琐，且探针设计复杂，成本高。

3

实验结果和讨论

检测结果如图1所示。使用MultiNA可明确地检测到分别来自小麦、荞麦、花生、虾、螃蟹的PCR扩增产物。MultiNA不仅可获得电泳图，还可获得凝胶图，因此数据具有高可靠性。虽然小麦和荞麦扩增产物比较接近，但分别得到了分离。MultiNA与琼脂糖凝胶电泳相比，具备出色的分辨率和灵敏度，可明确地检测出上述成分。

图1 微芯片电泳MultiNA对过敏性食品的检测



4

实验方法

4.1 试剂和样品

SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) S-11494

1 × TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen) 10597-011

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津制作所) 292-27910-91

引物：检测食品中螃蟹，花生，荞麦，小麦，虾过敏原引物设计如表1所示。

表1 螃蟹，花生，荞麦，小麦，虾的PCR引物设计

| 样品 | 引物序列 | 产物链长 (bp) |
|----|--|-------------|
| 螃蟹 | F: 5'-GCG TTA TTT TTT TTG AGA GTT CWT ATC GTA-3' W=A+G * | 62 |
| | 5'-GCG TAA TTT TTT CTG AGA GTT CTT ATC ATA-3' * | |
| | 5'-GCG TTA TTT TTT TTA AGA GTA CWT ATC GTA-3' W=A+G* | |
| | 5'-GCG TTA TTT CTT TTG AGA GCT CAT ATC GTA -3' * | |
| | *以上四种引物10:1:6:3混合后使用 | |
| | R: 5'-TTT AAT TCA ACA TCG AGG TCG CAA AGT-3' | |
| 花生 | F: 5'-CGA AGG AAA CCC CGC AAT AAA T-3' | 95 |
| | R: 5'-CGA CGC TAT TTA CCT TGT TGA G-3' | |
| 荞麦 | F: 5'-AAC GCC ATA ACC AGC CCG ATT-3' | 127 |
| | R: 5'-CCT CCT GCC TCC CAT TCT TC-3' | |
| 小麦 | F: 5'-CAT CAC AAT CAA CTT ATG GTG G-3' | 141 |
| | R: 5'-TTT GGG AGT TGA GAC GGG TTA-3' | |
| 虾 | F: 5'-TTA TAT AAA GTC TRG CCT GCC-3' R=A+G | 187 |
| | R: 5'-GTC CCT CTA GAA CAT TTA AGC CTT TTC-3' * | |
| | 5'-GTC CCT TTA TAC TAT TTA AGC CTT TTC-3' * | |
| | 5'-GTC CCC CCA AAT TAT TTA AGC CTT TTC-3' * | |
| | *以上三种引物1:1:1混合后使用 | |

4.2 样品处理及PCR反应体系和条件

4.2.1 样品制备：植物样品（例大豆、花生、小麦、腰果等）在DNA提取前需去皮，用灭菌洁净研钵或合适的粉碎装置将样品粉碎成100目粉末状；动物样品（例牛肉、鸡肉、鱼肉、虾肉等）在采样后需清洗干净，取其肌肉直接抽提DNA或置-20℃冰箱中保存备用。

4.2.2 DNA的提取和纯化：CTAB（溴化十六烷基三甲铵）方法

量取2 g制备样品放入聚丙烯离心管（容量50 mL），在该离心管中加入CTAB缓冲液*¹ 15 mL，使用匀质机混合。加入CTAB缓冲液30 mL，将离心管的边缘及均质器的顶部洗干净，反转混合后55℃加热30 min。加热处理后，搅拌溶液，量取均质溶液600 μL放入微型离心管(容量1.5 mL)中。接着在量取的溶液中加入500 μL苯酚/氯仿混合液*²，反转混合后使用漩涡混合器轻轻搅拌使其悬浮。悬浮后，室温7500 g条件下离心15 min，将分离的水层（上层）移至新的微型离心管中，此时，注意不要碰到中间层。在分出的水层中再次加

入500 μL 的氯仿-异戊醇混合液*³，反转混合后使用漩涡混合器轻轻搅拌使其悬浮。悬浮后，室温7500 g条件下离心15 min，将分离的水层（上层）移至新的微型离心管中。在分离的溶液中加入等容量的异丙醇（室温），反转混合后，室温7500 g条件下离心15 min，通过倾析法弃去上清液，注意不要触到沉淀物。接着，顺着壁面静静注入500 μL 的70%乙醇，之后，室温7500 g条件下离心1 min。离心后，尽可能吸取乙醇并丢弃，注意不要触到沉淀物。为了使残留在离心管的沉淀干燥，使用吸液器进行2~3 min的真空干燥处理。此时注意不要完全干燥。加入50 μL 的TE缓冲液*⁴充分混合后，室温静置15 min。静置期间，多次反转混合，以促使沉淀完全溶解。在所得到的溶解液中加入RNase A 5 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 加热30 min。在加热处理后的溶液中加入200 μL 的CTAB缓冲液，然后加入250 μL 氯仿-异戊醇混合液，反转混合后使用漩涡混合器轻轻搅拌使其悬浮。进行悬浮处理后，室温7500 g条件下离心15 min，将分离的水层（上层）移至新的微型离心管中。此时，注意分离时不要触到中间层。在分离出的溶液中加入200 μL 异丙醇反转混合。反转混合后，室温7500 g条件下离心10 min，使用倾析法弃去上清液，注意不要触到沉淀。紧接着，顺着壁面静静注入200 μL 的70%乙醇，之后室温7500 g条件下离心1 min。离心后，尽量吸取乙醇并丢弃，注意尽量不要触到沉淀。为了使离心管中残留的沉淀干燥，使用吸液器进行2~3min的真空干燥处理。此时注意不要完全干燥。加入50 μL 水混合后，室温静置15 min。静置期间，多次反转混合，促使沉淀溶解。将完全溶解的溶液作为DNA样品原液。

***1 CTAB缓冲液**

在烧杯中量取8 mL 0.5 mM EDTA (pH 8.0)、20 mL的1 M Tris-盐酸 (pH 8.0) 及56 mL的5 M NaCl水溶液，混合后，加水至150 mL。在此基础上加入十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 4 g，边加边搅拌，直至完全溶解。再次加水使溶液量达到200 mL，高压灭菌后作为CTAB缓冲液。

***2 苯酚-氯仿混合液**

1 M Tris/盐酸 (pH 8.0) 饱和苯酚和氯仿-异戊醇混合液以1:1 (v/v) 比例混合而成的溶液为苯酚-氯仿混合液。

***3 氯仿-异戊醇混合液**

氯仿和异戊醇以24:1 (v/v) 的比例混合而成的溶液为氯仿-异戊醇混合液。

***4 TE 缓冲液**

用水制备成的各最终浓度为10 mM Tris/盐酸 (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0) 的溶液为TE缓冲液。

4.2.3 DNA纯度的确认和定量：取DNA样品原液5 μL ，加入TE缓冲液45 μL 使之成为50 μL ，用BioSpec-nano在220–320 nm范围内测量紫外吸收光谱

4.2.4 使用PCR仪对提取出的DNA样品进行扩增。

4.2.5 将从小麦，荞麦，花生，螃蟹，虾提取出的DNA经PCR扩增后的产物进入MultiNA检测。

5

成本核算

微芯片电泳MultiNA分析成本核算如表2所示。

表2 成本核算

| 试剂名称 | 生产公司和货号 | 每个样品分析成本 (元) |
|---|------------------------|--------------|
| DNA-500 Reagent Kit for MultiNA | (岛津制作所) 292-27910-91 | 1.25 |
| SYBR [®] Gold Nucleic Acid Gel Stain | (Invitrogen) S-11494 | 0.004 |
| 25 bp DNA Ladder | (Invitrogen) 10597-011 | 0.03 |
| 合 计 | | 1.284 |

本成本核算仅供参考。